

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 22 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850120

研究課題名(和文)陸域由来の除草剤が藻類種間競争に及ぼす影響：除草剤は鞭毛藻赤潮発生のトリガーか？

研究課題名(英文)Effect of herbicides derived from land on competition between marine diatoms and flagellates: Do the herbicides trigger the flagellates blooms?

研究代表者

隠塚 俊満 (Onduka, Toshimitsu)

国立研究開発法人水産総合研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：00371972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年赤潮が頻発している福山港及び芦田川河口域における環境水中除草剤濃度を測定し、プロモブチド、プロマシル、シアナジン、及びプレチラクロールが比較的高い頻度で検出され、6月から8月付近で比較的高い傾向が認められた。また、比較的高い除草剤濃度の時期に鞭毛藻が検出された。珪藻キートセロスおよび鞭毛藻ヘテロシグマを用い、上記4種の除草剤の影響を検討した結果、4種のうち3種はヘテロシグマよりもキートセロスが高い感受性を示し、除草剤の曝露により珪藻の生長速度が抑えられ、鞭毛藻の生長速度の方が珪藻の生長速度より速くなった。これらのことから、鞭毛藻赤潮の発生に除草剤が影響を及ぼす可能性が想定された。

研究成果の概要(英文)：Ten kind of herbicides were identified in environmental water in Hukuyama Port and the mouth of the Ashida River where flagellate blooms were generated in recent years. Bromobutide, cyanazine, bromacil, and pretilachlor were detected at relatively high frequency, these concentration was relatively high from June to August. Flagellate cells were identified in that same period. The acute toxicities of these herbicides to a diatom *Chaetoceros* sp. and a flagellate *Heterosigma akashiwo* were assessed, *Chaetoceros* sp. was more sensitive to cyanazine, bromacil, and pretilachlor than *H. akashiwo*. The growth rate of the diatom was decreased with these herbicides, and the growth rate of the flagellate faster than that of the diatom in the toxicity tests. Herbicides may therefore influence generation of flagellate blooms.

研究分野：環境毒性学

キーワード：珪藻 鞭毛藻 プランクトン遷移 福山港

1. 研究開始当初の背景

日本近海では、シャットネラ等の鞭毛藻類による有害赤潮が頻発しており、しばしば甚大な漁業被害をもたらされる。これまでに、水温・塩分・栄養塩など、様々な観点から赤潮発生原因を巡る研究が行われ、鞭毛藻赤潮の発生時には、生態学的競合関係にある珪藻類が特異的に減少することが指摘されている。しかし、鞭毛藻の優占機構は未だ十分に解明されていない。鞭毛藻による赤潮は春から夏にかけて発生することが多く、この時期は水稲用除草剤の使用量が増加する時期とオーバーラップするものの、除草剤などの有害化学物質が藻類間競合関係に及ぼす影響を検討した事例は見あたらない。上述の知見を合わせ俯瞰した場合、シャットネラ等の赤潮鞭毛藻類と生態学的競合関係にある珪藻類に、有害化学物質により選択的減少が起きた場合には、結果的に鞭毛藻類による赤潮が誘発される可能性が想定される。

2. 研究の目的

本研究では、赤潮原因藻類及び珪藻類に対する感受性の差異から、除草剤などの有害化学物質が藻類間競合関係に影響を及ぼす可能性を検討する。赤潮頻発海域における除草剤濃度を測定し、主に検出される除草剤の濃度レベルを明らかにする。検出された除草剤について、鞭毛藻及び珪藻の感受性の差異を明らかにして藻類間競合関係に影響を及ぼす可能性の高い除草剤を推定すると共に、藻類間競合関係に及ぼす影響を明らかにする。さらに、選定した除草剤を鞭毛藻及び珪藻に単独で曝露し、感受性の差異の原因の解明を試みる。以上の結果により、鞭毛藻と珪藻の競合関係に除草剤がもたらす影響を検証し、除草剤が優占プランクトン種の決定にどのように関与するかを検証する。

3. 研究の方法

(1)環境水試料

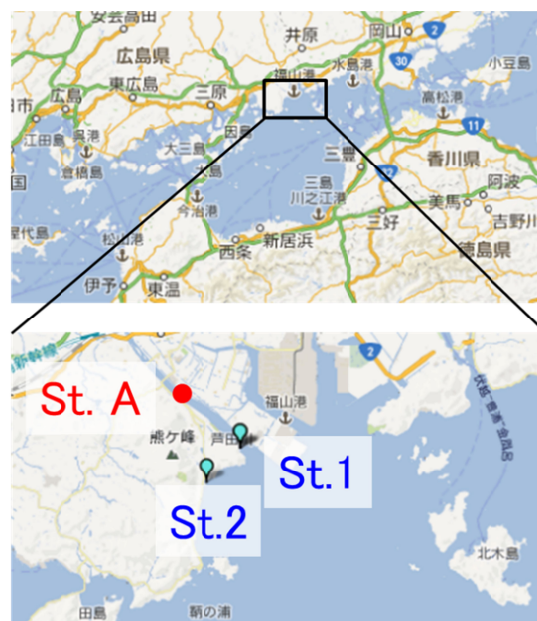
平成24年6月から平成28年3月にかけて、近年赤潮が頻発している福山港及び芦田川河口域(図1)のSt.1及びSt.2において赤潮が発生しやすい6月から8月を中心に計43回環境水を採水すると共に、St.2においては底層水についても採水し、海水中の珪藻及び鞭毛藻を検鏡によりカウントした。St.Aについては平成27年6月から平成28年3月にかけて、13回採水した。

(2)試験生物

福山港海水及び底質から鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* 及び珪藻 *Chaetoceros* sp.2 株を分離した。ネジ口試験管(φ24×200 mm、容量64 mL)に30 mLのSWM3培地を収容し、培地中で試験生物を継代培養した。培養にはグロースチャンバー(MLR-350、三

図1. 調査実施地点

洋電機)を用い、照明には紫外線をカットし



た蛍光灯(FL40S・N-EDL・NU、松下電器産業)を3本使用し、明期14h暗期10h、光合成光量子束密度40-80 μmol/m²/sec、温度20℃の条件で実施した。

(3)被験物質及び試験液

アトラジン、シアナジン、アラクロール、シマジン、シメトリン、メフェナセット、及びプロモブチドは和光純薬工業から、プロマシル、及びプレチラクロールはシグマ社から、イルガロールはチバ・スペシャルティ・ケミカルズからそれぞれ購入した。これらの除草剤のヘキサン溶液を調製し、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)用の標準液を調製した。内部標準物質として、フェナントレン、フルオランテン、及びクリセンの重水素体(林純薬工業)を用いた。

各影響試験における試験原液はシアナジン、プロマシル、プロモブチドをジメチルスルホキシド(DMSO、シグマ社)に溶解して作製した。この試験原液をDMSOで必要な濃度に希釈した後、SWM3培地で1万倍希釈し、試験液を調製した。

(4)微細藻類の除草剤3種に対する感受性差異の検討

OECD法を海産藻類の試験に合わせて一部改変し、以下の方法で藻類急性生長阻害試験を行った。ネジ口試験管(φ24×200 mm、容量64 mL)に30 mLのSWM3培地を収容し、上記培養試験と同様の条件下で72時間の毒性試験を行った。

被験物質濃度は、予備試験の結果を元に、3種の微細藻類に対するプロマシルの試験及び *Chaetoceros* sp.に対するシアナジンの試験においては2.5、5、10、20、及び40 μg/L、*H. akashiwo* に対するシアナジンの試験においては5、10、20、40、及び80 μg/L、3種の微細藻類に対するプロモブチドの試験においては100 μg/Lに設定し、試験原液を各濃度区に所定の濃度となるよう添加した。各濃度区のDMSOの濃度は一定(100 mg/L)とし、助剤対照区、および無添加対照区を設けた。

なお、各実験区はそれぞれ 3 セットずつ設けた。試験開始 0、24、48 および 72 時間目にターナー蛍光光度計 (MODEL10-AU-005 FLUOROMETER, Turner Designs 社) を用いて生長測定を行い、予め測定しておいたそれぞれの藻類の細胞数と相対蛍光値の関係から各試験区の細胞数を推定し、生長曲線に基づいて生長速度を算出した。試験開始時の細胞濃度は約 10^3 cells/mL とした。採水は試験開始前と終了後に行い、試験液はガラス繊維ろ紙 (GF/C フィルター、GE Healthcare) でろ過して懸濁物を除いた後、分析に供した。被検物質測定に十分な液量を得るため、同一試験区のろ液をあわせて除草剤濃度を測定した。急性毒性値は 72 時間の試験で生長速度が半減した除草剤濃度 (72-h EC_{50}) とした。この値は、対照区に対する試験区の 1 日あたりの生長速度、および平均実測除草剤濃度からプロビット法により算出した。

(5) 珪藻及び鞭毛藻の藻類混合培養条件における除草剤の影響検討

ネジ口試験管 ($\phi 24 \times 200$ mm、容量 64 mL) に 30 mL の SWM3 培地を収容し、上記培養試験と同様の条件下で 72 時間の毒性試験を行った。被検物質はプロマシルを用い、濃度は、0.625、1.25、2.5、5、及び 10 $\mu\text{g/L}$ 、に設定し、試験原液を各濃度区に所定の濃度となるよう添加した。各濃度区の DMSO の濃度は一定 (100 mg/L) とし、助剤対照区、および無添加対照区を設けた。なお、各実験区はそれぞれ 3 セットずつ設けた。

この試験液に *Chaetoceros* sp. 及び *H. akashiwo* を各藻類の初期細胞数を 1000 cells/mL 程度になるよう添加した。なお、各実験区はそれぞれ 3 セットずつ設けた。試験開始 0 及び 72 時間目に試験液を採水し、試験液に含まれる細胞数を顕微鏡下で計測すると共に、上記影響試験と同様にろ過後、分析に供した。被検物質測定に十分な液量を得るため、同一試験区のろ液をあわせて除草剤濃度を測定した。

(6) 除草剤曝露時の珪藻及び鞭毛藻の発着遺伝子解析

1L のねじ口瓶に 1L の SWM3 培地を収容し、5 $\mu\text{g/L}$ プロマシル区及び助剤対照区 (100 mg/L DMSO) を設定し、各濃度区の DMSO の濃度は一定 (100 mg/L) とした。この試験液に *Chaetoceros* sp. 及び *H. akashiwo* をそれぞれ別々に藻類の初期細胞数を 1000 cells/mL 程度になるよう添加し、上記培養試験と同様の条件下で 72 時間の曝露試験を行った。試験開始 0 及び 72 時間目に試験液を採水し試験液に含まれる細胞数を顕微鏡下で計測すると共に、上記影響試験と同様にろ過後、分析に供した。また、試験終了時には培養液を遠心分離して藻類を集めた後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて、Total RNA を抽出し、-80 で保存した。この RNA から精製した

mRNA (poly(A)-RNA) を断片化、cDNA 合成により poly(A)-RNA の配列を次世代シーケンサー HiSeq (Illumina 社) を用いて、網羅的に取得した。得られたトリミング済みのリードデータを用いて、アセンブルプログラム Trinity を用いた de novo transcriptome アセンブルを実施後、アセンブル結果を参照配列として、各サンプルのトリミング済みリードデータを用いたマッピングと、推定 Transcript 配列の発現強度の算出、及び曝露区及び対照区の発現強度を比較した。

(7) 除草剤の分析

環境水 1 L または上記影響試験の試験液 50 mL をジクロロメタンで 2 回抽出後、1 mL まで濃縮した。内部標準物質としてフェナントレン、フルオランテン、及びクリセンの重水素体を添加後、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を用いて除草剤濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 環境水中の除草剤濃度の測定

10 種の除草剤について環境水中濃度を測定した結果、プロモブチド、シアナジン、プロマシル、プレチラクロールの順に検出頻度が高かった。アラクロールの検出頻度は比較的高いものの、最高検出濃度が 50 ng/L 未満であり、藻類間競合関係に影響を及ぼす可能性は低いと推測された。シマジン、シメトリン、イルガロールについては検出頻度が低く、また、最高検出濃度が 100 ng/L 未満であるため、藻類間競合関係に影響を及ぼす可能性は低いと推測された (表 1)。

検出頻度の高い除草剤について季節変化を検討した。物質の種類によっては、他の時期でも高濃度の時期があるものの、6 月から 8 月付近で比較的高い傾向が認められた (図 2)。また、この図に鞭毛藻ヘテロシグマやシャットネラが検出された時期を重ねると、比較的除草剤濃度が高い時期に鞭毛藻が検出され (図 2)、鞭毛藻赤潮の発生に除草剤が影響を及ぼす可能性が想定された。

表 1. 除草剤の検出範囲 (ng/L) 及び頻度

	プロモブチド	シマジン	アトラジン	シメトリン
検出範囲	<30-519	<29-43	<14-136	<32
検出頻度	44/137	2/137	8/137	0/137
	アラクロール	プロマシル	シアナジン	イルガロール
検出範囲	<7.4-43	<56-179	<39-127	<17
検出頻度	22/137	34/137	34/137	0/137
	プレチラクロール		メフェナセット	
検出範囲	<15-153		<46-91	
検出頻度	28/137		10/137	

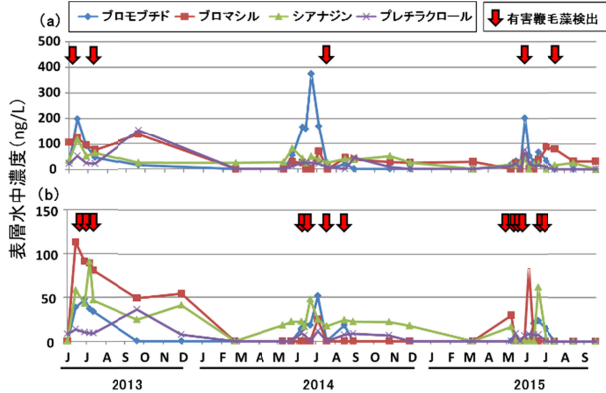


図2. (a) St.1, (b) St.2における表層水中除草剤濃度の季節変化及び鞭毛藻赤潮検出時期

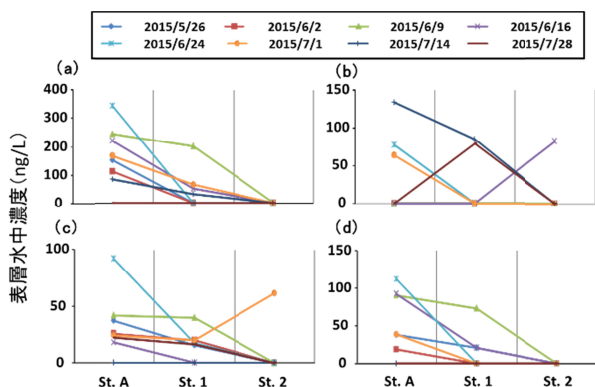


図3. (a) プロモブチド (b) プロマシル (c) シアナジン (d) プレチラクロールの環境水中濃度の地点間比較

検出頻度の高い除草剤について平成 27 年 5 月から 7 月の海水中濃度の地点間比較を行った結果、プロモブチド及びプレチラクロールについては何れの採水時期についても検出濃度が St. 2 > St. 1 > St. A となり、河川からの負荷が推測された(図3)。シアナジン及びプロマシルについては、一部例外があるものの検出濃度が概ね同様の傾向となり、これらの物質についても、河川由来の可能性が示唆された(図3)。

(2) 鞭毛藻及び珪藻の除草剤に対する感受性検討

検出頻度の高い物質のうちプロモブチド、プロマシル、シアナジン、プレチラクロールについて、福山港海水または底質から分離した *H. akashiwo* 及び 2 種の *Chaetoceros* sp. に対する急性毒性値を検討した結果、*H. akashiwo* よりも *Chaetoceros* sp. の方がプロマシル、シアナジン、及びプレチラクロールに対して高い感受性を示した(表2)。プロモブチドについては 100µg/L で実施した曝露試験においても、急性毒性値を算出するほどの生長速度抑制影響は認められなかった。

毒性値が得られたプロマシル及びシアナジンの曝露時における *Chaetoceros* sp.1 及び *H. akashiwo* の生長速度を比較した結果、助剤

対照区(除草剤曝露濃度 0 µg/L)では *Chaetoceros* sp.1 が *H. akashiwo* より 3 日間の平均生長速度が速く、プロマシル曝露濃度が 7.0 µg/L 以上またはシアナジン曝露濃度が 26 µg/L 以上で生長速度がそれぞれ逆転し、*H. akashiwo* の生長速度が速くなった(図4)。

表2. 除草剤の藻類に対する急性毒性値 72-h EC₅₀ (µg/L)

	<i>H. akashiwo</i>	<i>Chaetoceros</i> sp.1	<i>Chaetoceros</i> sp.2
プロマシル	14	4.7	6.1
シアナジン	26	11	17
プロモブチド	>100	>100	>100
プレチラクロール	37	6.6	5.9

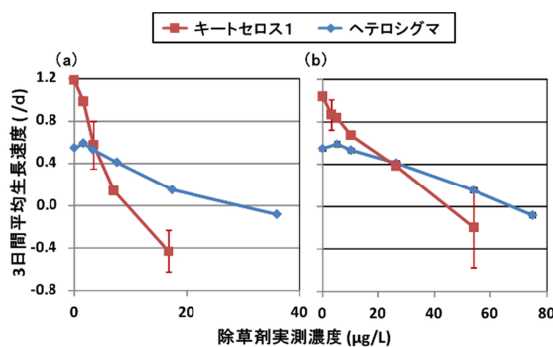


図4. (a) プロマシル (b) シアナジン曝露試験における *Chaetoceros* sp.1 と *H. akashiwo* の平均生長速度。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。

(3) 鞭毛藻及び珪藻混合培養条件における除草剤の影響評価

感受性検討において、最も低い濃度で影響が認められたプロマシルについて、混合培養条件における各藻類の生長速度を比較した。単独曝露試験における各藻類の生長速度の比較(図4)と同様にプロマシル曝露により *H. akashiwo* の速度が珪藻 *Chaetoceros* sp.1 のそれを上回る結果(図5)が得られたが、試験に用いる藻類の活性により試験結果が大きく左右され、再現性のある結果を得るまで至らなかった。

(4) 鞭毛藻及び珪藻の除草剤曝露区及び対照区の遺伝子発現強度比較

次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析により、各サンプル約 4200 万から 4400 万リードを得た。得られたデータからプロマシル曝露区及び対照区における *Chaetoceros* sp.1 と *H. akashiwo* の遺伝子発現強度を比較した。各藻類について横軸を 2 群間の平均発現量、縦軸を 2 群間の発現量の比としてプロットした散布図(MAプロット)を作成した(図6)。*Chaetoceros* sp.1 では、遺伝子の発現強度が *H. akashiwo* より総じて多く、また有意に発現強度が変化した遺伝子

が *H. akashiwo* よりも多い傾向が認められた。

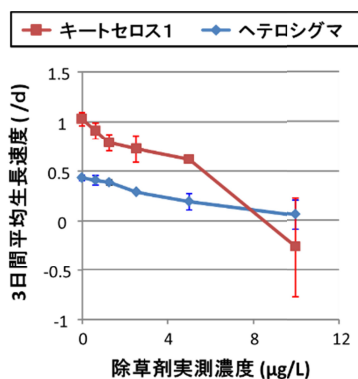


図 5. *Chaetoceros* sp.1 と *H. akashiwo* の混合培養条件下でのプロマシル曝露試験における両藻類の平均生長速度。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。

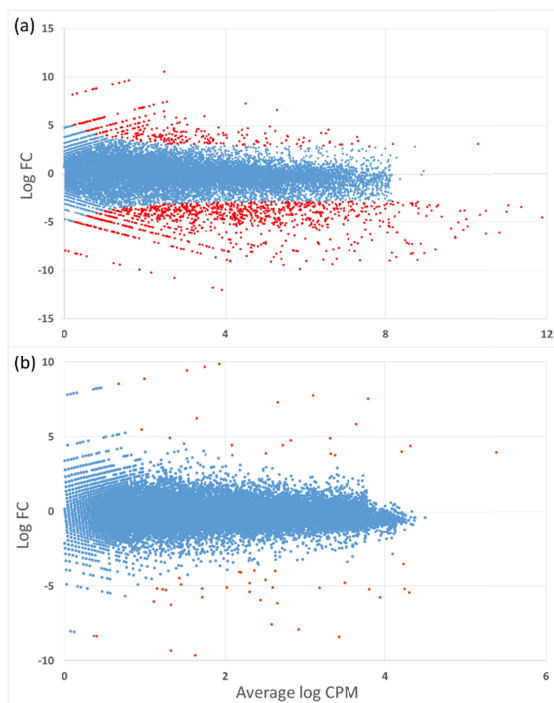


図 6. *Chaetoceros* sp.1(a)と *H. akashiwo*(b)のプロマシル曝露区及び対照区の MA プロット $P < 0.001$ の遺伝子を赤で示す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 4 件)

1. Onduka Toshimitsu, Nakayama Natsuko, Ohkubo Nobuyuki, Mochida Kazuhiko, Effect of the antifouling biocide polycarbamate on competition between marine diatoms and flagellates at different nutrient levels, 17th International Symposium on Toxicity

Assessment, Aug. 8, 2015, Bellingham (USA).

2. 隠塚俊満, 中山奈津子, 大久保信幸, 持田和彦, 防汚物質ポリカーバメートが藻類競合関係に及ぼす影響：生長速度を指標にして, 第 21 回日本環境毒性学会研究発表会, 平成 27 年 9 月 2 日, 東洋大学白山キャンパス(東京都・文京区)
3. 隠塚俊満, 中山奈津子, 伊藤克敏, 持田和彦, 福山港海水中で検出した除草剤に対する珪藻および鞭毛藻の感受性比較, 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 平成 27 年 3 月 30 日, 東京海洋大学品川キャンパス(東京都・港区)
4. 隠塚俊満, 防汚物質としても使用されている農薬 2 種 of 海産生物に及ぼす影響, 平成 26 年度漁場環境保全関係研究開発推進会議有害物質部会シンポジウム「沿岸生態系に及ぼす農薬の影響を考える」, 平成 26 年 11 月 19 日, ホテルチューリッヒ東方 2001(広島県・広島市)

[その他]

国立研究開発法人水産総合研究センター
公開情報クイックサーチ

https://fradb.dc.affrc.go.jp/fradb-web/researcher/Researcher_645.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

隠塚 俊満 (ONDUKA TOSHIMITSU)

国立研究開発法人水産総合研究センター・瀬戸内海区水産研究所・主任研究員
研究者番号：00371972

(3) 連携研究者

中山 奈津子 (NAKAYAMA NATSUKO)

国立研究開発法人水産総合研究センター・瀬戸内海区水産研究所・主任研究員
研究者番号：20612675

伊藤 克敏 (ITO KATSUTOSHI)

国立研究開発法人水産総合研究センター・瀬戸内海区水産研究所・主任研究員
研究者番号：80450782

伊藤 真奈 (ITO MANA)

国立研究開発法人水産総合研究センター・瀬戸内海区水産研究所・任期付研究員
研究者番号：80450782

持田 和彦 (MOCHIDA KAZUHIKO)

国立研究開発法人水産総合研究センター・瀬戸内海区水産研究所・有害物質グループ長
研究者番号：00371964

